



TRABALHO FINAL

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

Clínica Universitária de Obstetrícia e Ginecologia

Criopreservação de tecido ovário como técnica de preservação da fertilidade

Ana Carolina Teixeira Chaves

MAIO'2017

TRABALHO FINAL

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

Clínica Universitária de Obstetrícia e Ginecologia

Criopreservação de tecido ovário como técnica de preservação da fertilidade

Ana Carolina Teixeira Chaves

Orientado por:

Dr. Joaquim Nunes

Resumo

O aumento da sobrevivência de pacientes com cancro contribuiu para a consciencialização da qualidade de vida de pacientes submetidas a terapêuticas gonadotóxicas. Deste modo, a preservação da fertilidade destas mulheres é atualmente uma preocupação. Métodos como a criopreservação de oócitos e/ou embriões são utilizados para a preservação da fertilidade, mas a criopreservação de tecido ovárico (CTO) é a única opção para raparigas pré-púberes e uma alternativa para mulheres jovens sem indicação para outras técnicas. Após tratamentos oncológicos, estas mulheres correm o risco de entrar em falência ovárica prematura (FOP). Um diagnóstico de cancro é stressante do ponto de vista psicológico, mas quando associado à perda potencial da fertilidade tem um impacto psicológico ainda maior. Esta é uma questão problemática, sobretudo em raparigas pré-púberes, uma vez que outras técnicas não lhes podem ser oferecidas. A CTO é ainda uma técnica experimental, mas tem revelado resultados satisfatórios pelo que futuramente poderá fazer parte da “rotina” dos métodos de preservação da fertilidade. Contudo, algumas limitações devem ser ultrapassadas para que este objetivo seja alcançado. Dada a pertinência deste tema na atualidade, este trabalho pretende uma revisão sistemática sobre esta técnica.

Abstract

The increased survival of cancer patients has raised awareness of the quality of life in patients undergoing gonadotoxic therapy. Thus, preserving the fertility of these women is currently a concern. Methods such as cryopreservation of oocytes and/or embryos are used to preserve fertility, but cryopreservation of ovarian tissue (CTO) is the only option for prepubescent girls and an alternative for young women with no indication for other techniques. After cancer treatments, these women are at risk for premature ovarian failure (FOP). A diagnosis of cancer is already psychologically stressful, but the potential loss of fertility has an even greater psychological impact. This is a problematic issue especially in prepubertal girls, since other techniques can not be offered to them. CTO is still an experimental technique, but has shown satisfactory results so that it may be part of the "routine" of fertility preservation methods in the future. However, some limitations must be overcome in order for this objective to be

achieved. Given the pertinence of this topic at the present time, this work intends a systematic review on this technique.

Palavras-chave

Criopreservação de tecido ovárico; autotransplante de tecido ovárico criopreservado; falência ovárica prematura; preservação da fertilidade.

Keywords

Cryopreservation of ovarian tissue; autotransplantation of cryopreserved ovarian tissue; premature ovarian failure; preservation of fertility.

O Trabalho Final exprime a opinião do autor e não da FML

Índice

Resumo	2
Palavras-chave.....	3
Introdução	5
Metodologia.....	5
Resultados	6
Discussão	6
Indicações para criopreservação de tecido ovárico	6
Técnica.....	8
1. Métodos de criopreservação	9
2. Transplante ortotópico e heterotópico.....	10
3. Técnicas alternativas ao transplante de tecido ovárico	11
Risco de reintrodução de células malignas	13
1. Técnicas para a detecção de células malignas em tecido ovárico criopreservado	13
2. Segurança do autotransplante de tecido ovárico dependendo do tipo de tumor	16
Sucesso da criopreservação de tecido ovárico	19
Por quanto tempo ficará funcional o tecido ovárico transplantado?	20
Conclusão	21
Agradecimentos	21
Bibliografia.....	22

Introdução

O sucesso da quimioterapia (QT) e radioterapia (RT) é capaz de aumentar a sobrevida de mulheres afetadas pelo cancro. No entanto, estas também trazem consequências como a FOP, devido aos seus efeitos gonadotóxicos. A FOP diz respeito ao “esgotamento” prematuro do *pool* de folículos primordiais existentes no ovário e caracteriza-se por um estado de hipogonadismo hipergonadotrófico [1]. Quando esta ocorre antes da puberdade, estaremos perante uma amenorreia primária. Se pelo contrário, ocorrer após a puberdade, presenciaremos uma amenorreia secundária e consequentemente menopausa precoce [1]. A FOP tem um risco baixo (< 20%) a alto (> 80%) de ocorrer, dependendo dos tratamentos/doses utilizados e da idade da paciente [2].

Segundo Imbert *et al.* 2014, mais de 10% dos cancros são diagnosticados em raparigas jovens, e destas cerca de 70% afirmaram preocupar-se com a sua fertilidade no momento do diagnóstico e 50% pretendiam ter filhos após o tratamento [3]. As doenças hematológicas são as que mais afetam as raparigas jovens [3], pelo que muitas necessitarão de transplante de medula óssea (TMO), capaz de induzir FOP em mais de 80% dos casos [4]. Na criopreservação de oócitos e/ou embriões, a mulher já deverá ter tido a menarca, e no segundo caso, também deverá ter um parceiro ou aceitar a doação de espermatozóides. Contudo, quando as pacientes não reúnem estas condições, a CTO surge como uma alternativa, sobretudo para raparigas adolescentes, e a única opção para raparigas pré-púberes [5].

O programa de CTO surgiu no ano 2000 na Dinamarca [6] e hoje em dia é considerada uma técnica promissora para a preservação da fertilidade. É ainda uma técnica experimental, porque levanta algumas questões de segurança, sobretudo em relação ao risco de recidiva tumoral com o autotransplante de tecido ovárico criopreservado (TOC).

Metodologia

Foram pesquisados artigos entre os anos 2011 e 2017 com as seguintes palavras-chave: CTO; autotransplante de TOC; risco de reintrodução de células malignas na CTO; segurança do autotransplante de tecido ovárico (TO); indicações para CTO e CTO em raparigas pré-púberes. A pesquisa foi sobretudo realizada na língua inglesa através

da base de dados EBSCO e alguns artigos foram pesquisados a partir da bibliografia de outros. Consequentemente, os artigos encontrados a partir da pesquisa inicial foram triados através dos títulos e resumos, e posteriormente verificou-se a sua relevância para esta revisão.

Resultados

Foram encontrados 411 artigos. Destes foram selecionados maioritariamente artigos das revistas *Human Reproduction* e *Fertility and Sterility*. Preferiram-se revisões sistemáticas, estudos retrospectivos ou casos clínicos com pertinência para a realização desta revisão. Foram incluídos artigos pesquisados a partir das referências bibliográficas de outros, cujos anos não estavam estabelecidos nos critérios usados para a pesquisa inicial (isto é, 2003, 2004, 2006-2010). Contudo, esses artigos foram englobados nesta revisão dada a importância do seu conteúdo.

Discussão

Indicações para criopreservação de tecido ovárico

As indicações para CTO incluem: risco de FOP superior a 50%; idade inferior a 35 anos (variável de acordo com os níveis de hormona anti-mulleriana (HAM) e contagem de folículos antrais (CFA)); sobrevida superior a 50% aos 5 anos (variável de acordo com o tratamento); e ausência de doença disseminada e de contradições para cirurgia ou anestesia [6]. Os critérios de Edimburgo incluem ainda serologias negativas para o vírus da imunodeficiência humana (VIH), hepatite e sífilis [7].

A idade cronológica nem sempre corresponde à idade biológica, pelo que Paradisi *et al.* 2016 [8], incluem a avaliação basal da HAM e CFA na seleção de pacientes para CTO. Deste modo, pacientes no percentil 25 (HAM entre 1,2-1,6 ng/ml e CFA entre 9-10 estruturas foliculares) estão indicadas para CTO, mas no percentil 5 (HAM entre 0,31-0,40 ng/ml e CFA de 5 estruturas foliculares) não têm indicação para CTO, independentemente da idade para ambos os percentis. Quando os valores destes 2 parâmetros estão entre os percentis 5-25, as pacientes estão indicadas para CTO desde que tenham menos que 35 anos.

Segundo Jensen *et. al.* 2016 [1], a CTO deve ser recomendada a todas as mulheres que após QT/RT apresentem um risco elevado de FOP e consequentemente infertilidade, como por exemplo, mulheres que necessitem de agentes alquilantes, regime de condicionamento antes do TMO, irradiação total do corpo (*total body irradiation* - TBI) ou doses elevadas de radiação para a área crânio-espinhal, abdominal ou pélvica. A CTO não atrasa o início do tratamento oncológico e pode ser feita após o início da QT [3] [9] [10]. Além disso, está indicada em mulheres com tumores hormono-dependentes, pelo que é uma alternativa para as que não podem fazer indução da ovulação para recuperação de oócitos [3] [9]. Uma outra indicação, não relacionada com terapêuticas oncológicas, é a FOP resultante da síndrome de Turner ou galactosemia [1]. Por fim, a CTO não só serve para preservar a fertilidade, como também para recuperar o estado hormonal pré-menopausa, aliviando os sintomas e efeitos adversos negativos da menopausa precoce causada pela FOP [11].

As neoplasias malignas hematológicas são a indicação mais comum para CTO. Dentro desta categoria, linfoma de Hodgkin (LH), a leucemia e o linfoma não-Hodgkin (LNH) são as principais indicações por ordem decrescente [12] [13]. Dentro da leucemia, pacientes com a leucemia mieloide crónica (LMC), leucemia mielóide aguda (LMA) e leucemia linfoblástica aguda (LLA) são os que mais frequentemente recorrem à CTO [12]. Para além destas doenças, o cancro da mama também é uma das principais indicações [3] [14].

A CTO com posterior autotransplante tem sido pensada para a indução da puberdade em raparigas pré-púberes que sofreram FOP [1]. Contudo, um estudo recente reuniu a visão de endocrinologistas sobre este tema e concluiu que o transplante de tecido ovário (TTO) não parece ser uma boa alternativa para a indução da puberdade [15]. Atualmente, esta realiza-se com a administração gradual de estrogénios exógenos, de modo a mimetizar o desenvolvimento fisiológico. Embora o TTO pareça mais natural, este procedimento não mimetiza o aumento gradual dos estrogénios [15]. Após a FOP, os níveis de gonadotrofinas estão muito aumentados, pelo que quando o TO é transplantado, ocorrerá um crescimento súbito de vários folículos, desencadeando níveis elevados de estrogénios. Consequentemente, o desenvolvimento pubertário será repentino, com efeitos secundários negativos para a adolescente [15]. Além disto, existem outras implicações, como a segurança do autotransplante, que ainda carece de

investigação nestas idades, e o facto da duração do TO transplantado também ser incerta [15]. Contudo, a indução bem-sucedida da puberdade através de TTO já foi descrita em 2 raparigas de 13 anos [16] [17].

Salienta-se que as raparigas pré-púberes submetidas a terapêuticas gonadotóxicas beneficiam sempre da CTO. Em caso de FOP, mesmo que tenham feito indução da puberdade com terapêutica hormonal, se desejarem engravidar necessitarão de TTO. Além disso, segundo Jensen *et al.* 2016 [1], mesmo que estas não apresentem logo FOP, têm um risco aumentado de desenvolvê-la antes dos 40 anos, pelo que se deve assegurar a preservação da fertilidade destas raparigas através da CTO.

Técnica

A CTO é uma técnica experimental que consiste em criopreservar TO idealmente antes das terapêuticas oncológicas, com o objetivo de armazenar folículos primordiais e posteriormente promover a maturação desses folículos, quer seja *in vivo* através do TTO, quer seja *in vitro* [18]. A CTO não interfere com a esteroidogénese e gametogénese do TO, e pode ser realizada em qualquer fase do ciclo menstrual [7].

A colheita de TO pode ser realizada através de ooforectomia ou biópsias ováricas múltiplas [19]. A criopreservação de um ovário inteiro é sobretudo realizada em pacientes com maior probabilidade de falha completa da função ovárica, isto é, pacientes submetidas a tratamentos oncológicos muito agressivos [9]. Nestes casos, o ovário é completamente removido em conjunto com parte do pedículo vascular, através de laparoscopia (mais comum) ou laparotomia [9]. O pedículo vascular permitirá a introdução e remoção de crioprotetor no ovário, e facilitará o transplante ao permitir o aporte sanguíneo e oxigenação do ovário [9]. Contudo, também tem limitações como: a necessidade de uma cirurgia mais invasiva; risco de isquemia por tromboembolismo do pedículo vascular; comprometimento da sobrevivência de todo o ovário, caso a anastomose do pedículo vascular falhe; e dificuldades com a criopreservação [9]. Atualmente, o transplante de ovário inteiro criopreservado apenas é realizado em mulheres adultas [20] e ainda não foram relatados nascimentos [9] [20].

Quando apenas TO é obtido, através de biópsias, normalmente por via laparoscópica, o córtex ovárico é separado da medula e dissecado em pequenos fragmentos que posteriormente serão criopreservados [9]. A sobrevivência do TO é em

parte dependente da neovascularização do local de transplante [9] [20]. Esta neovascularização parece estar relacionada com a viabilidade das células do estroma [21].

Existem muitos protocolos diferentes para criopreservação e descongelação de TO. Contudo, há pouca informação sobre a eficácia e eficiência desses protocolos, pelo que Bastings *et al.* 2016 [22] compararam dois protocolos existentes. Concluíram que há diferenças consideráveis na viabilidade do TO. Essas diferenças incluem a captação da glicose pelo TO e diferenças relacionadas com o crioprotetor (etilenoglicol e *dimethyl sulfoxide* – (DMSO)). Além disso, não encontraram relação entre a viabilidade do folículo e os níveis de captação de glicose, mas sim relação entre esta e a viabilidade das células do estroma, algo que deveria ser analisado em todos os protocolos. Assim sendo, este estudo conclui que uma otimização dos protocolos pode aumentar as taxas de sucesso da CTO [22].

1. Métodos de criopreservação

Existem dois métodos de criopreservação de TO: congelamento lento (método padrão) e vitrificação. O congelamento lento refere-se à exposição do TO ao crioprotetor, com posterior arrefecimento lento de uma forma programável até aproximadamente -140°C , e por fim, arrefecimento em azoto líquido a -196°C [9]. A vitrificação é eficaz na criopreservação de oócitos e blastocistos e parece ser uma opção válida para a CTO [24]. Ao contrário do congelamento lento, é um método rápido de criopreservação que contempla concentração do crioprotetor mais elevada e taxa de arrefecimento mais rápida [9]. Apesar da vitrificação de ter sido desenvolvida para eliminar o risco de formação de cristais de gelo, não parece ser um bom método para criopreservar todo o ovário, pois possibilita a rutura do pedículo e da superfície do ovário, proporcionando uma interface para a formação de cristais de gelo e permeação inconsistente do crioprotetor [9] [23] [24].

Tal como já mencionado, uma das diferenças entre estes dois métodos é a duração do congelamento. O congelamento lento é um procedimento demorado com distribuição homogénea dos crioprotetores pelo TO. Pelo contrário, durante a vitrificação, o rápido congelamento pode comprometer a distribuição homogénea do crioprotetor, contribuindo para vitrificação incompleta e danos no tecido vitrificado [24] [25].

Amorim *et al.* 2011 [26], constataram que tanto o congelamento lento como a vitrificação preservam a morfologia dos folículos primordiais e primários, mas a preservação dos folículos secundários e do estroma foi melhorada com a vitrificação. Igualmente, Ting *et al.* 2011 [27], demonstraram que a lesão das células da granulosa em folículos secundários é mais frequente com o congelamento lento do que com a vitrificação. Ainda, Klocke *et al.* 2015 [24] concluíram que a integridade morfológica do TO, a libertação de estradiol e as taxas de proliferação folicular e apoptose são semelhantes tanto com o congelamento lento como com a vitrificação.

Concluindo, embora a vitrificação do TO apresente resultados promissores, ainda não foram relatadas gestações após vitrificação do TO e mais investigação é necessária para que esta substitua o congelamento lento [9].

2. Transplante ortotópico e heterotópico

O transplante ortotópico de TO consiste na reimplantação do TO na cavidade pélvica que poderá ser no ovário remanescente ou próximo deste [9]. Pelo contrário, transplante heterotópico significa que o TTO é realizado fora da cavidade pélvica, por exemplo, no antebraço ou na parede abdominal [9]. É provável que entre dois a nove meses após o autotransplante ortotópico e heterotópico bem-sucedidos, as funções ováricas retomem com possibilidade de gravidez espontânea no primeiro caso, e possibilidade de gravidez após recolha de oócitos e fertilização *in vitro* (FIV) no segundo caso [20].

O transplante ortotópico pode ser realizado de 2 formas dependendo da presença de ovário remanescente e ambas são bem-sucedidas [28]. Se um ovário está presente, é removida parte do córtex desse ovário para que se tenha acesso à medula e posteriormente, córtex de TO descongelado é colocado na medula do ovário remanescente [28]. No caso de inexistência de ambos os ovários, uma bolsa peritoneal pode ser criada em duas etapas, uma para induzir a angiogénese e outra para o TTO, com introdução dos fragmentos de TO na bolsa peritoneal [28] [30]. Este método fornece melhor suprimento sanguíneo ao TO, pelo que parece associar-se a um melhor desenvolvimento folicular [30].

O transplante ortotópico já resultou em vários nascimentos [9]. De facto, uma gestação espontânea é possível quando TO é transplantado para o ovário remanescente e desde que as trompas de Falópio estejam permeáveis, pois deste modo encontrar-se-á

num ambiente favorável quer do ponto de vista hormonal quer anatômico [9]. Contudo, o número de fragmentos transplantados é limitado pelo tamanho do ovário remanescente e trata-se de um procedimento invasivo [9]. No caso do transplante heterotópico, embora seja necessária FIV complementar, neste tipo de transplante não há limitação para o número de fragmentos transplantados. Além disso, é um procedimento de fácil execução, monitorização folicular, colheita de oócitos e ainda, possibilita a fácil detecção de recidiva tumoral [9] [28]. Uma outra vantagem é a possibilidade de poder ser realizado quando existem aderências pélvicas que impedem o transplante ortotópico [9] [28]. No entanto, os locais usados para transplante heterotópico podem não proporcionar um ambiente ótimo para o desenvolvimento folicular [28]. Apesar disto, a recuperação da função endócrina e o desenvolvimento folicular já foram demonstrados após transplante heterotópico e este já resultou em 2 nascimentos (2 meninas gêmeas) [10] [28] [29].

3. Técnicas alternativas ao transplante de tecido ovárico

Convencionalmente, com o TTO a maturação dos folículos primordiais realiza-se *in vivo*. Contudo, algumas pacientes não têm indicação para TTO devido ao risco de reintrodução de células malignas, sobretudo em casos de leucemia. Deste modo, algumas alternativas têm sido desenvolvidas, como é o caso da maturação *in vitro* (*in vitro maturation* – IVM) de oócitos imaturos, clinicamente disponível, e o transplante de folículos isolados através de um ovário artificial, ainda em fase experimental [13] [31] - [36].

Os oócitos imaturos presentes nos folículos antrais não sobrevivem ao procedimento de criopreservação. Deste modo, é possível que antes da CTO, os oócitos imaturos sejam isolados através de punção dos folículos antrais, quer seja *in situ* no campo cirúrgico, quer seja *ex situ* após ooforectomia ou biópsias ováricas, com posterior IVM e vitrificação dos oócitos já maduros [3] [9] [37]-[39]. Esta é uma técnica adjuvante da CTO que não necessita de estimulação ovárica e pode ser oferecida tanto a mulheres adultas quanto a raparigas pré-púberes, com o objetivo de aumentar o potencial de recuperação da fertilidade e substituir o TTO quando este está contraindicado [3] [20] [37] [40]-[42]. Contudo, existem poucos resultados promissores desta estratégia em raparigas pré-púberes [31] [43]. A taxa de IVM de oócitos em raparigas pré-puberdade é relativamente baixa (18%) em comparação com a taxa IVM

em mulheres adultas (40%), possivelmente devido ao ambiente hormonal e aos processos atresícos que ocorrem nos folículos antrais na faixa etária mais jovem [31]. Além disso, o TO pré-púbere parece apresentar uma maior proporção de folículos anormais [39].

Segundo Fasano *et al.* 2011 [37] a combinação de CTO e recuperação de oócitos imaturos é viável independentemente da fase do ciclo menstrual, do uso de contraceção oral e da idade da paciente, e preferencialmente deve ser realizado antes da QT. Esta técnica pode ainda ser associada à FIV com criopreservação de embriões se existir parceiro masculino. De facto, foi relatado em Singapura, o primeiro nascimento resultante de embrião criopreservado concebido a partir de oócitos maturados *in vitro* [42].

Uma outra alternativa ao TTO é a criação de um ovário artificial contendo folículos ováricos isolados. Os folículos ováricos são separados do ambiente estromal e da rede vascular/nervosa por uma membrana basal, pelo que é possível isolá-los do ovário [44]. Contudo, o principal desafio está em desenvolver um ovário artificial biocompatível e biodegradável que mantenha a estrutura tridimensional dos folículos ováricos e que permita o seu desenvolvimento [32]. O ovário artificial deve assegurar uma boa proliferação/diferenciação celular e o recrutamento de vasos sanguíneos, favorecendo a sobrevivência e o crescimento dos folículos pré-antrais [32] [45]. Para isso, são essenciais as células estromais e endoteliais do ovário - células ováricas autólogas (*autologous ovarian cells* - OCs) - que devem ser transplantadas juntamente com folículos ováricos [46]. As células endoteliais são importantes para a angiogénese e as células do estroma são fundamentais para a sobrevivência e desenvolvimento dos folículos ováricos. É exetável que após o transplante, estas proliferem e substituam gradualmente o material usado para a matriz, circundando os folículos tal como ocorre no ovário *in vivo*. Deste modo, pretende-se que haja degradação do material da matriz e uma reestruturação com tecido do estroma [32].

Vanacker *et al.* 2012 [47] demonstraram que uma matriz baseada em hidrogel de alginato e matrigel pode ser usada para a criação de um ovário artificial. Este tipo de matriz mostrou-se biodegradável, biocompatível, permitiu a vascularização e foi capaz de encapsular OCs promovendo a sua sobrevivência e proliferação. Além disso, provocou uma baixa resposta inflamatória.

Posteriormente, Luyckx *et al.* 2014 [32] procuram perceber se esqueletos de fibrina poderiam ser usados como matriz para a construção de um ovário artificial, e de acordo com a taxa de recuperação folicular obtida, constataram que a fibrina é um material muito promissor. De facto, segundo Luyckx *et al.* 2013 [33] as células do estroma ovárico podem sobreviver/proliferar em coágulos de fibrina após cultura *in vitro*. Além disto, a fibrina contribuiu para a angiogénese através do “recrutamento” de células endoteliais [32].

É importante salientar que aquando do isolamento de folículos ováricos, não devem ser isoladas simultaneamente células malignas [48]. Por exemplo, no caso da leucemia, em que o risco de existirem células malignas no TO é muito elevado, é importante confirmar que os folículos ováricos isolados estão livres de células leucémicas. Por fim, esta técnica ainda é experimental, mas tem apresentado resultados promissores em modelos animais [20] [48].

Risco de reintrodução de células malignas

Há pacientes propostas para CTO que possuem tumores capazes de metastizar para o ovário. Tendo em conta que a recolha de TO é executada, na maioria das vezes, antes das terapêuticas de QT/RT, algumas células tumorais podem surgir no TOC [10] [49]. Neste sentido, o risco de reintrodução de células malignas com o TTO é uma grande preocupação [10]. De facto, existem 2 casos relatados de recidiva de doença após TTO, mas foi inconclusiva a sua relação direta [11] [50]. Contudo, esta relação não deve ser descartada e a presença de células malignas no TOC antes do autotransplante deve ser sempre avaliada. As evidências clínicas sugerem que o TTO é um procedimento seguro, mas são necessários mais dados sobre o grau de segurança desta técnica [51].

1. Técnicas para a deteção de células malignas em tecido ovárico criopreservado

As técnicas usualmente utilizadas para a deteção de células malignas no TOC são: histologia, imuno-histoquímica, reação em cadeia de polimerase por transcrição reversa quantitativa (PCR-RT) e xenotransplantes [13] [49] [51].

Para os tumores que não apresentam marcadores/antígenos específicos que possam ser identificados por PCR-RT ou imuno-histoquímica, respetivamente, a histologia é o exame de primeira linha [5]. No entanto, esta mostra-se inferior no que diz respeito à capacidade de identificar células malignas no TOC. Durante um exame histológico, a observação de células tumorais pode passar despercebida [5]. Num estudo de Dolmans *et al.* 2010 [52] avaliou-se a presença de células malignas no TO de pacientes com leucemia. Ao contrário da histologia, que não identificou células malignas, a técnica de PCR-RT foi positiva em 33% dos pacientes com LMC e em 70% dos pacientes com LLA. De facto, a PCR-RT parece ser o método mais sensível e específico. No entanto, tal como já mencionado, para que esta técnica possa ser executada, devem existir marcadores específicos, por exemplo “aberrações” cromossómicas, que ao serem detetadas diferenciam as células normais das células tumorais [53]. Assim, o grande problema prende-se com o facto de que nem todos os tumores possuem marcadores específicos que os tornem passíveis de identificação por PCR-RT [51] [52]. Além disso, quando um sinal positivo de PCR-RT é detetado, apenas é fornecida a informação de que RNA ou DNA de células tumorais estão presentes naquele fragmento de TO, mas nenhuma informação acerca da viabilidade daquelas células é transmitida [51]. O mesmo acontece para a histologia e para imuno-histoquímica, em que a identificação de células tumorais não garante a sua viabilidade [54]. Assim sendo, estas técnicas não informam sobre a capacidade das células tumorais detetadas promoverem recidiva tumoral [5] [51].

Outra limitação é o chamado “viés de amostra”. Diferentes partes do mesmo fragmento cortical de TO quando avaliadas podem fornecer resultados diferentes em relação à presença/ausência de células malignas [51] [54]. Isto ocorre porque a distribuição de células malignas no TO não é uniforme. Além disso, quando um fragmento de TO é analisado, este já não será utilizado para transplante, pelo que utilizar-se-ão outros fragmentos que poderão conter uma informação diferente quanto à presença/ausência de células malignas. Assim, estas técnicas são capazes de identificar doença residual mínima (DRM), mas não garantem que o fragmento de TO transplantado seja seguro [5] [35] [51]. Este “viés de amostra” também se aplica ao xenotransplante. Nesta técnica, fragmentos de córtex de TO serão xenotransplantados para ratinhos *camundongo* imunodeficientes e consequentemente, o desenvolvimento tumoral nestes animais será avaliado, informando acerca da presença/ausência de

células tumorais no fragmento de TO xenotransplantado [5]. Contudo, quando os ratinhos *camundongo* não desenvolvem tumor, não podemos garantir que todo o TO esteja desprovido de células tumorais, devido a este “viés de amostra” [5]. No que diz respeito à viabilidade das células tumorais presentes no fragmento de TO, o xenotransplante proporciona-nos uma melhor percepção, pois se o *camundongo* desenvolver doença, temos a garantia de que aquele fragmento de TO continha células malignas capazes de recidiva tumoral [5]. Contudo, esta técnica é aplicada em ratinhos *camundongo* imunodeficientes, pelo que não é certo até que ponto se podem extrapolar achados de xenotransplantes para a situação humana [5] [35] [51].

Infelizmente, nenhum destes métodos é um método estabelecido para a identificação de células malignas no TOC, e qualquer um deles apresenta vantagens e desvantagens, pelo que idealmente devem ser utilizados em combinação [13] [51].

Devido à necessidade de se aperfeiçoarem/descobrirem novas técnicas para a detecção de células malignas no TOC, vários estudos têm sido desenvolvidos. Uma vez que é muito raro TO com metástases serem fornecidos para fins de investigação, um estudo preliminar apresentou um sistema modelo que imita a doença metastática ovárica de diferentes tipos de tumores [49]. Através da injeção de linhas celulares de leucemia, linfoma, sarcoma de Ewing e cancro da mama em córtex de TO humano e de bovino, obtiveram-se tiras de córtex ovárico com células malignas de vários tipos de tumor, a partir das quais podem ser desenvolvidas novas estratégias para a detecção e remoção de células malignas do TOC. Este modelo parece útil para o desenvolvimento de técnicas de remoção, uma vez que as células malignas mantêm proximidade com o TO [49]. As células tumorais originadas de um microambiente natural têm um comportamento muito diferente das células tumorais cultivadas *in vitro*, e a sua remoção parece ser influenciada por interações com a matriz extracelular (*extracellular matrix* - ECM), pelo que é fundamental que as células malignas interajam com o TO [55]. Por fim, é importante mencionar que os autores não excluem a possibilidade de estas linhas celulares utilizadas terem um comportamento diferente das metástases ováricas disseminadas do tumor primário. Além disso, para a criação deste modelo utilizaram TO de mulheres com > 39 anos (idade muito superior às que optam por CTO), o que pode influenciar na criação destas novas técnicas a partir deste modelo. Ainda assim, estes resultados preliminares parecem muito promissores [49].

As técnicas usualmente utilizadas para detetar células malignas, avaliam fragmentos de TO que posteriormente não serão utilizados para autotransplante, havendo sempre o risco de reintrodução destas células. Neste sentido, Peters *et al.*, 2016 [56], pensaram num método que identificasse células malignas no TO, preservando a sua função reprodutiva, para que o mesmo fragmento analisado pudesse ser usado no transplante. Deste modo, utilizaram a imagiologia de fluorescência no infravermelho próximo (*near-infrared fluorescence imaging* - NIRF), uma técnica capaz de distinguir tecidos malignos de tecidos normais em tempo real, mantendo os tecidos viáveis. Posteriormente, conjugaram a uma sonda de NIRF um peptídeo com alta afinidade para marcadores apenas expressos na superfície celular de células de cancro da mama. Dos marcadores testados, a E-caderina pareceu ser o mais adequado para servir como sonda específica de células de cancro da mama no TO. Contudo, quase todos os marcadores testados surgiram em células epiteliais de quistos de inclusão, pelo que serão necessários métodos adicionais para distingui-los das células de cancro da mama.

Um outro estudo desenvolveu um método para detetar DRM no ovário de pacientes com leucemia aguda através de citometria de fluxo multicolor (*multicolor flow cytometry* - MFC) [34]. Este método foi aplicado a 11 pacientes com leucemia aguda e a avaliação de DRM no ovário foi positiva para 3 dos pacientes (27%). Contudo, não é certo se o nível de DRM detetada é capaz de induzir uma recidiva tumoral. Neste sentido, este método poderá ser usado em associação ao xenotransplante. A MFC pareceu ter uma boa correlação com resultados de PCR-RT e mostrou ser um método muito sensível e específico. Esta poderá ser aplicada a todos os pacientes com leucemia aguda e atualmente é a única técnica disponível para quando não existem marcadores moleculares específicos. Concluindo, a MFC é promissora na avaliação do risco de reintrodução de células malignas em pacientes com leucemia [34].

2. Segurança do autotransplante de tecido ovárico dependendo do tipo de tumor

O risco de surgirem células malignas no TOC, parece ser mais elevado nos casos de doença sistémica, como a leucemia aguda, mas está menos esclarecido para os tumores sólidos como o cancro da mama [57]. Este risco parece ser influenciado pelo tipo/fase do cancro, quantidade de células malignas transferidas e o intervalo de tempo entre a colheita do TO e o início do tratamento oncológico [35] [51] [58]. Ainda assim,

é desconhecido o risco exato de reintrodução de células malignas para cada situação específica [35].

Os tumores têm sido classificados com risco baixo, intermédio ou alto de envolverem os ovários [11] [59]. Por conseguinte, a realização do TTO apresenta maior ou menor segurança conforme o tipo de tumor que a paciente apresenta. A leucemia e o linfoma são os dois tipos de tumores que ocupam posições extremas em termos de segurança. Em relação à leucemia, o TTO nunca foi relatado em pacientes (à exceção de pacientes em remissão completa), uma vez que resultados obtidos de técnicas de PCR-RT, xenotransplantes e autópsias foram consistentes ao demonstrar a elevada presença de células leucémicas no TOC, comprometendo a sua segurança [51] [60]. Pelo contrário, diferentes estudos apontam que o linfoma é o tumor que oferece maior segurança para a realização de TTO [13] [35].

Bastings *et al.* 2013 [35] realizaram uma revisão sistemática que incluiu estudos clínicos e de autópsias. Segundo os resultados obtidos, não foram detetadas metástases no TOC de pacientes com linfoma e com cancro da mama, embora estudos de autópsia apontem para que metástases ováricas sejam comuns no cancro da mama avançado. Células malignas no TOC foram detetadas em pacientes com leucemia e num paciente com sarcoma de Ewing. Resultados referentes ao cancro do estômago, endométrio e colorretal, demonstraram que o TTO nestes casos suscita alguma preocupação. No caso de pacientes com cancro do colo do útero de baixo estadió, os resultados foram mais tranquilizadores. Assim, Bastings *et al.*, 2013 [35] concluíram que o TTO não deve ser considerado em pacientes com leucemia, ao contrário do linfoma, embora a segurança, mesmo nestes pacientes, nunca possa ser assegurada a 100%. Em relação aos outros tumores, a segurança do autotransplante deve ser discutida [35].

Segundo Greve *et al.*, 2012 [61] a CTO em pacientes com leucemia parece segura apenas quando estão em remissão completa. Esta conclusão foi obtida após CTO de pacientes com leucemia em remissão completa e posterior xenotransplante, sem desenvolvimento tumoral nos ratinhos *camundongo*. Pensa-se que, uma vez em remissão completa, existem células malignas na circulação sistémica em número insuficiente para causar recidivas tumorais [61]. Além disso, estudos adicionais mostraram resultados semelhantes - dois pacientes previamente tratados para a leucemia receberam TTO sem recidivas tumorais [62] [63].

Em relação à segurança do TTO em pacientes com linfoma, outros estudos também demonstraram inexistência de células malignas no TO de pacientes com LH e LNH [13] [51] [64].

Além das doenças hematológicas, o cancro da mama também é uma das principais indicações para CTO. Embora o ovário não seja o local preferencial de metastização, podem existir micrometástases ováricas no cancro da mama. Segundo resultados de autópsias, o risco de envolvimento dos ovários em pacientes jovens com cancro da mama era de 19,4% [57] [65] e ainda outros estudos sugerem que metástases de cancro da mama nos ovários têm sido relatadas com uma prevalência variando de 13 a 47% [35] [56]. Estas parecem surgir no cancro da mama avançado e são mais frequentes para o carcinoma lobular em oposição ao carcinoma ductal [66].

Sanchez-Serrano *et al.*, 2009 [67], Rosendahl *et al.* 2011 [68] e Donnez *et al.*, 2013 [28], não identificaram metástases ováricas em pacientes com cancro da mama, através da histologia e da imuno-histoquímica. O estudo de Rosendahl *et al.* 2011 [68] concluiu que o TTO parece seguro no cancro da mama de estadio inicial. Contudo, Kyono *et al.*, 2010 [65], através de estudos de autópsia, encontraram metástases ováricas em 24,2% dos pacientes com cancro da mama. Dada a controvérsia, Luyckx *et al.* 2013 [66], procuraram investigar esta questão utilizando métodos mais sensíveis, como o xenotransplante e PCR-RT. Neste sentido, avaliaram pela primeira vez a presença de células malignas no TOC de pacientes com cancro da mama avançado, através de xenotransplantes de longa duração, PCR-RT, histologia e imuno-histoquímica. Para a realização da PCR-RT, selecionaram o gene mamaglobina 2 (MGB-2) como marcador específico de células da mama. Perante os resultados obtidos, o TTO de pacientes com cancro da mama avançado parece seguro. Contudo, a expressão do gene MGB-2 foi detetada em alguns casos, embora não seja conhecido o potencial maligno das células que expressam este gene. Posto isto, Luyckx *et al.* 2013 [66] concluíram que investigações que incluam técnicas mais sensíveis e específicas, como a PCR-RT com múltiplos marcadores, são necessárias para confirmar estes resultados.

Posteriormente, Bockstaele *et al.* 2015 [57] avaliaram pela primeira vez a expressão de vários marcadores da mama (mamaglobina 1) (MGB-1) e MGB-2, proteína bruta de doença quística-15 (*gross cystic disease fluid protein-15* - GCDFP-

15), pequena mucina epitelial da mama (small breast epithelial mucine - SBEM) através de PCR-RT no TO de pacientes com cancro da mama, de modo a identificarem micrometástases ováricas. A técnica de PCR-RT foi associada a xenotransplantes. Este estudo concluiu que os marcadores MGB-1 e GCDFP-15 pareciam ser os mais promissores, devido aos elevados valores preditivos positivos. Quanto ao MGB-2 este pareceu mais eficaz na deteção de células malignas na medula do TOC, embora não tenha sido avaliada a correlação entre a expressão positiva de MGB-2 na medula com a expressão positiva no córtex. Quanto ao SBEM, este marcador não parece adequado para selecionar córtex ovárico livre de micrometástases. Por fim, constataram que os resultados de xenotransplantes foram negativos, questionando a aplicabilidade desta técnica. Assim sendo, a sua relevância clínica deverá ser futuramente investigada.

Por fim, é importante considerar que no cancro da mama, o risco de recidiva tumoral pode ser influenciado pelo restabelecimento do estado hormonal pré-menopausa, conseguido após o TTO. Isto pode ser determinante em tumores da mama hormono-dependentes [35].

Sucesso da criopreservação de tecido ovárico

As primeiras gestações após o TTO foram relatadas na década de 2000 [3]. Mais especificamente, o primeiro nascimento ocorreu em 2004 na Bélgica, após autotransplante ortotópico de TOC numa paciente com LH [69]. Atualmente, já foram notificados mais de 60 nascimentos após CTO [22] [70] [71] e relata-se mais de 90% de recuperação da função ovárica após TTO [60] [72]. Contudo, eficiência da CTO é desconhecida, uma vez que em casos de insuficiência ovárica primária pode existir gravidez espontânea. Neste sentido, não é certo até que ponto todas as gravidezes após transplante ortotópico resultaram do TO transplantado e não do ovário remanescente que poderia manter alguma função residual [9] [60].

Em 2014, na Bélgica, ocorreu o primeiro nascimento após autotransplante ortotópico e heterotópico de TOC aos 13 anos de idade, numa rapariga com FOP posterior ao regime de condicionamento de um transplante de células estaminais hematopoiéticas realizado para anemia falciforme homozigótica [73]. Este é o primeiro caso de sucesso na recuperação da fertilidade com TOC antes da menarca. Embora a CTO seja a única opção para raparigas pré-púberes com FOP, a sua eficácia não estava comprovada. Deste modo, este caso contribuiu para demonstrar que a CTO pode ser

viável para a preservação da fertilidade quando realizado durante a infância/pré-puberdade [73].

Descrição do caso:

Aos 10 anos de idade, a paciente já tinha iniciado o desenvolvimento pubertário, mas ainda não tinha tido a menarca. Aos 13 anos realizou CTO, com ooforectomia por via laparoscópica. Após o regime de condicionamento desenvolveu FOP, com aumento das gonadotrofinas. A menarca foi induzida aos 15 anos através de reposição hormonal. 10 anos depois, a paciente manifestou desejo em engravidar, pelo que suspendeu a terapêutica hormonal (manifestando níveis hormonais de FOP) e realizou TTO. Antes do autotransplante, 2 fragmentos de TO foram descongelados para avaliação da densidade folicular. Consecutivamente, foram transplantados 4 fragmentos de TO no ovário esquerdo residual, 6 na bolsa peritoneal direita e 5 subcutaneamente. Após o procedimento, os níveis hormonais representavam um estado pré-menopausa e a atividade ovárica foi observada em todos os locais transplantados. A menstruação ocorreu 5 meses após o transplante e foi seguida por ciclos menstruais regulares. Com 27 anos, isto é, 2 anos após o autotransplante, teve uma gravidez espontânea e em novembro de 2014, nasceu um menino saudável. Durante o processo a paciente mudou de parceiro o que poderá explicar em parte este intervalo de tempo de 2 anos [73].

Por quanto tempo ficará funcional o tecido ovárico transplantado?

A duração funcional do TO transplantado é variável. Segundo, Jensen *et al.* 2015 [6], há pacientes que mantêm função ovárica há mais de 10 anos, outras mantêm há mais de 5 anos e algumas durante menos de 1 ano. Na Dinamarca, 75% das mulheres apresentaram TO transplantado funcional durante pelo menos 1 ano [14]. Segundo Donnez *et al.* 2013 [28] a duração média do TO transplantado é de 4-5 anos.

O tempo que o TO transplantado ficará funcional é em parte impossível de se avaliar, porque o número de folículos transplantados é desconhecido [6]. Contudo, alguns fatores podem influenciar a sua duração funcional. A idade, por exemplo, é um fator determinante. TOC de raparigas jovens contém maior densidade folicular do que mulheres mais velhas, pelo que em princípio a duração do TO transplantado deverá ser maior quanto mais cedo for realizada a CTO [28]. Outros fatores são: o uso de QT antes

da CTO; o tamanho do fragmento de TO transplantado; métodos de CTO; distribuição não homogênea dos folículos em peças corticais e o potencial angiogénico do local de transplante, que influencia a sobrevivência do TO [28].

No estudo de Jensen *et al.* 2015 [6], os autores não conseguiram identificar parâmetros específicos para avaliar a duração funcional do TO transplantado, pelo que concluem que o TO permanece ativo na maioria das mulheres e é necessário esperar que estas tenham a menopausa para se avaliar a sua longevidade.

Conclusão

A CTO é uma técnica promissora para a preservação da fertilidade. Esta já demonstrou recuperar eficazmente a função ovárica e atualmente a taxa de gravidez é cerca de 30% entre as pacientes que desejam engravidar [6] [22]. Apesar de terem sido relatadas poucas recidivas tumorais após TTO, a segurança desta técnica carece de mais investigação assim como de métodos de deteção de células malignas mais eficazes.

Em Portugal, a CTO está incluída nas técnicas de preservação da fertilidade feminina, sendo realizada no Centro de Preservação da Fertilidade, no Serviço de Medicina da Reprodução do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, e os seus custos são assegurados pelos Serviço Nacional de Saúde.

A CTO existe há quase 20 anos e ainda só 60 nascimentos resultaram desta técnica e a sua verdadeira eficácia requer um tempo de observação mais longo [6]. Esta deve ser cada vez mais investigada e as suas limitações devem ser ultrapassadas, pois é a única opção para raparigas pré-púberes - uma forte razão para que avanços sejam feitos no sentido de optimizá-la.

Concluindo, apesar de experimental, vários estudos têm demonstrado que a CTO com posterior autotransplante é uma alternativa razoável para preservação da fertilidade em mulheres que recebem tratamentos gonadotóxicos [60].

Agradecimentos

Agradeço ao meu orientador, Dr. Joaquim Nunes, pela disponibilidade e orientações prestadas; à minha irmã pela ajuda, compreensão e motivação transmitidas;

à minha mãe, ao meu pai e ao meu namorado pelo apoio enquanto escrevia este trabalho.

Bibliografia

1. Jensen AK, Rechnitzer C, Macklon KT, Ifversen MRS, Birkebaek N, Clausen N, Sørensen K, Fedder J, Ernst E, Andersen Y. Cryopreservation of ovarian tissue for fertility preservation in a large cohort of young girls: focus on pubertal development. *Hum Reprod* 2017; **32** (1):154-164.
2. Lee SJ, Schover LR, Partridge AH, Patrizio P, Wallace WH, Hagerty K, Beck LN, Brennan LV, Oktay K. American Society of Clinical Oncology Recommendations on Fertility Preservation in Cancer Patients. *J Clin Oncol* 2006; **24** (18):2917-2931.
3. Imbert R, Moffa F, Tsepelidis S, Simon P, Delbaere A, Devreker F, Dechene J, Ferster A, Veys I, Fastrez M, Englert Y, Demeestere I. Safety and usefulness of cryopreservation of ovarian tissue to preserve fertility: a 12-year retrospective analysis. *Hum Reprod* 2014; **29** (9):1931-1940.
4. Demeestere I, Simon P, Emilian S, Delbaere A, Englert Y. Fertility Preservation: Successful Transplantation of Cryopreserved Ovarian Tissue in a Young Patient Previously Treated for Hodgkin's Disease. *The Oncologist* 2007; **12** (12):1437-1442.
5. Bastings L, Beerendonk CCM, Westphal JR, Braat DDM, Peek R. Cryopreservation and Autotransplantation of Ovarian Tissue in Cancer Patients: Is It Safe? *J Adolesc Young Adult Oncol* 2013; **2** (1):31-34
6. Jensen AK, Kristensen SG, Macklon KT, Jeppesen JV, Fedder J, Ernst E, Andersen CY. Outcomes of transplantations of cryopreserved ovarian tissue to 41 women in Denmark. *Hum Reprod* 2015; **30** (12):2838-2845.
7. Anderson RA, Mitchell RT, Kelsey TW, Spears N, Telfer EE, Wallace WH. Cancer treatment and gonadal function: experimental and established strategies for fertility preservation in children and young adults. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2015; **3** (7): 556-567
8. Paradisi R, Maccioca M, Vicenti R, Rossi S, Morselli-Labate AM, Mastroberto M, Serachioli R, Fabbri R. New insights in the selection and

- management of cancer patients applicants for ovarian tissue cryopreservation. *Gynecol Endocrinol* 2016; **32** (11):881-885.
9. The Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine. Ovarian tissue cryopreservation: a committee opinion. *Fertil Steril* 2014; **101**:1237-1243.
 10. Demeestere I, Simon P, Englert Y, Delbaere A. Preliminary experience of ovarian tissue cryopreservation procedure: alternatives, perspectives and feasibility. *Reprod Biomed Online* 2003; **7**(5):572-579.
 11. Kim SS. Assessment of long term endocrine function after transplantation of frozen-thawed human ovarian tissue to the heterotopic site: 10 year longitudinal follow-up study. *J Assist Reprod Genet* 2012; **29** (6):489-493.
 12. Dolmans MM, Luyckx V, Donnez J, Andersen CY, Greve T. Risk of transferring malignant cells with transplanted frozen-thawed ovarian tissue. *Fertil Steril* 2013; **99** (6):1514-1522.
 13. Dolmans MM, Jadoul P, Gilliaux S, Amorim CA, Luyckx V, Squifflet J, et al. A review of 15 years of ovarian tissue bank activities. *J Assist Reprod Genet* 2013; **30** (3): 305-314.
 14. Bockstaele L, Tsepelidis S, Dechene J, Englert Y, Demeestere I. Safety of Ovarian Tissue Autotransplantation for Cancer Patients. *Obstet Gynecol Int* 2012; **2012**:1-6.
 15. Wolff MV, Stute P, Christa F. Autologous transplantation of cryopreserved ovarian tissue to induce puberty—the endocrinologists' view. *Eur J Pediatr* 2016; **175** (12): 2007-2010.
 16. Poirot C, Abirached F, Prades M, Coussieu C, Bernaudin F, Piver P. Induction of puberty by autograft of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet* 2012; **379** (9815):588.
 17. Ernst E, Kjærsgaard M, Birkebæk NH, Clausen N, Andersen CY. Case report: Stimulation of puberty in a girl with chemo- and radiation therapy induced ovarian failure by transplantation of a small part of her frozen/thawed ovarian tissue. *Eur J Cancer* 2013; **49** (4): 911-914.
 18. Hoekman EJ, Smit VTHBM, Fleming TP, Louwe LA, Fleuren GJ, Hilders CGJM. Searching for metastases in ovarian tissue before autotransplantation: a tailor-made approach. *Fertil Steril* 2015; **103** (2):469-477.

19. Anderson RA, Mitchell RT, Kelsey TW, Spears N, Telfer EE, Wallace WHB. Cancer treatment and gonadal function: experimental and established strategies for fertility preservation in children and young adults. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2015;**3** (7): 556-567.
20. Salama M, Isachenko V, Isachenko E, Rahimi G, Mallmann P. Updates in preserving reproductive potential of prepubertal girls with cancer: Systematic review. *Oncol Hematol* 2016; **103**: 10-21.
21. Demeestere I, Simon P, Emiliani S, Delbaere A, Englert Y. Orthotopic and heterotopic ovarian tissue transplantation. *Hum Reprod Update* 2009; **15** (6):649-665.
22. Bastings L, Westphal JR, Beerendonk CCM, Bekkers RLM, Zusterzeel PLM, Hendriks JCM, Braat DDM, Peek R. Clinically applied procedures for human ovarian tissue cryopreservation result in different levels of efficacy and efficiency. *J Assist Reprod Genet* 2016; **33**(12): 1605-1614.
23. Courbiere B, Caquant L, Mazoyer C, Franck M, Lornage J, Salle B. Difficulties improving ovarian functional recovery by microvascular transplantation and whole ovary vitrification. *Fertil Steril* 2009; **91** (6):2697-2706.
24. Klocke S, Bündgen N, Köster F, Eichenlaub-Ritter U, Griesinger G. Slow-freezing versus vitrification for human ovarian tissue cryopreservation. *Arch Gynecol Obstet* 2015; **291** (2):419-426.
25. Dittrich R, Mueller A, Hoffmann I, Beckmann MW, Maltaris T. Cryopreservation of Complex Systems: Slow Freezing Has Not Had Its Day Yet. *Rejuv Res* 2007; **10**(1):101-102.
26. Amorim CA, Curaba M, Van Langendonck A, Dolmans MM, Donnez J. Vitrification as an alternative means of cryopreserving ovarian tissue. *Reprod Biomed Online* 2011; **23** (2):160-186.
27. Ting AY, Yeoman RR, Lawson MS, Zelinski MB. In vitro development of secondary follicles from cryopreserved rhesus macaque ovarian tissue after slow-rate freeze or vitrification. *Hum Reprod* 2011; **26** (9):2461-2472.
28. Donnez J, Dolmans MM, Pellicer A, Diaz-Garcia C, Sanchez Serrano M, Schmidt KT, Ernst E, Luyckx V, Andersen CY. Restoration of ovarian activity and pregnancy after transplantation of cryopreserved ovarian tissue: a review of 60 cases of reimplantation. *Fertil Steril* 2013; **99** (6):1503-1513.

29. Stern CJ, Gook D, Hale LG, Agresta F, Oldham J, Rozen G, Jobling T. Delivery of twins following heterotopic grafting of frozen-thawed ovarian tissue. *Hum Reprod* 2014; **29** (8):1828.
30. Kim SS, Lee WS, Chung MK, Lee HC, Lee HH, Hill D. Long-term ovarian function and fertility after heterotopic autotransplantation of cryobanked human ovarian tissue: 8-year experience in cancer patients. *Fertil Steril* 2009; **91**(6):2349-2354.
31. Segers I, Mateizel I, Van Moer E, Smits J, Tournaye H, Verheyen G, De Vos M. In vitro maturation (IVM) of oocytes recovered from ovariectomy specimens in the laboratory: a promising 'ex vivo' method of oocyte cryopreservation resulting in the first report of an ongoing pregnancy in Europe. *J Assist Reprod Genet* 2015; **32**(8):1221-1231.
32. Luyckx V, Dolmans MM, Vanacker J., Legat C., Fortuño Moya C, Donnez J, et al. A new step toward the artificial ovary: survival and proliferation of isolated murine follicles after autologous transplantation in a fibrin scaffold. *Fertil Steril* 2014;**101**(4):1149-1156.
33. Luyckx V, Dolmans MM, Vanacker J, Scalercio SR, Donnez J, Amorim CA. First step in developing a 3D biodegradable fibrin scaffold for an artificial ovary. *J Ovarian Res* 2013;**6**(1):83.
34. Zver T, Alvergnas- Vieille M, Garnache-Ottou F, Roux C, Amiot C. A new method for evaluating the risk of transferring leukemic cells with transplanted cryopreserved ovarian tissue. *J Assist Reprod Genet* 2015; **32** (8):1263-1266.
35. Bastings, L, Beerendonk CC, Westphal JR, Massuger LF, Kaal SE, van Leeuwen FE, et al. Autotransplantation of cryopreserved ovarian tissue in cancer survivors and the risk of reintroducing malignancy: a systematic review. *Hum Reprod Update* 2013; **19** (5): 483-506.
36. Chian RC, Uzelac PS, Nargund G. In vitro maturation of human immature oocytes for fertility preservation. *Fertil Steril* 2013;**99**(5): 1173-1181.
37. Fasano G, Moffa F, Dechène J, Englert Y, Demeestere I. Vitriification of in vitro matured oocytes collected from antral follicles at the time of ovarian tissue cryopreservation. *Reprod Biol Endocrinol* 2011; **9**:150.
38. Fadini R, dal Canto M, Mignini Renzini M, Milani R, Fruscio R, Cantu MG, et al. Embryo transfer following in vitro maturation and cryopreservation of

- oocytes recovered from antral follicles during conservative surgery for ovarian cancer. *J Assist Reprod Genet* 2012; **29** (8):779-781.
39. Abir R, Ben-Aharon I, Garor R, Yaniv I, Ash S, Stemmer SM, et al. Cryopreservation of *in vitro* matured oocytes in addition to ovarian tissue freezing for fertility preservation in paediatric female cancer patients before and after cancer therapy. *Hum Reprod* 2016; **31** (4): 750-762.
 40. Fatemi HM, Kyrou D, Al-Azemi M, Stoop D, De Sutter P, Bourgain C, et al. Ex-vivo oocyte retrieval for fertility preservation. *Fertil Steril* 2011; **95** (5): 1787.e15-1787.e17.
 41. Bocca S, Dedmond D, Jones E, Stadtmauer L, Oehninger S. Successful extracorporeal mature oocyte harvesting after laparoscopic oophorectomy following controlled ovarian hyperstimulation for the purpose of fertility preservation in a patient with borderline ovarian tumor. *J Assist Reprod Genet* 2011; **28** (9): 771-772.
 42. Prasath EB, Chan ML, Wong WH, Lim CJ, Tharmalingam MD., Hendricks M, et al. First pregnancy and live birth resulting from cryopreserved embryos obtained from in vitro matured oocytes after oophorectomy in an ovarian cancer patient. *Hum Reprod* 2014; **29** (2):276-278.
 43. Revel A, Revel-Vlik S, Aizenman E, Porat-Katz A, Safran A, Ben-Meir A, et al. At what age can human oocytes be obtained? *Fertil Steril* 2009;**92** (2):458-463.
 44. Rodgers RJ, Irving-Rodgers HF, Russell DL. Extracellular matrix of the developing ovarian follicle. *Reproduction* 2003;**126** (4):415-424.
 45. Amorim CA. Artificial ovary. In: Donnez J, Kim SS, editors. Principles and practice of fertility preservation. Cambridge, UK: Cambridge University Press; 2011:448–58.
 46. Dath C, Dethy A, Van Langendonck A, Van Eyck AS, Amorim CA, Luyckx V, et al. Endothelial cells are essential for ovarian stromal tissue restructuring after xenotransplantation of isolated ovarian stromal cells. *Hum Reprod* 2011;**26** (6):1431-1439.
 47. Vanacker J, Luyckx V, Dolmans MM, Des Rieux A, Jaeger J, Van Langendonck A, et al. Transplantation of an alginate-matrigel matrix containing isolated ovarian cells: First step in developing a biodegradable scaffold to

- transplant isolated preantral follicles and ovarian cells. *Biomaterials* 2012; **33**:6079-6085.
48. Soares M, Sahrari K, Amorim CA, Saussoy P, Donnez J, Dolmans MM. Evaluation of a human ovarian follicle isolation technique to obtain disease-free follicle suspensions before safely grafting to cancer patients. *Fertil Steril* 2015;**104** (3):672-680.
 49. Peek R, Bastings L, Westphal JR, Massuger LF, Braat DD, Beerendonk CC. A preliminary study on a new model system to evaluate tumour-detection and tumour-purging protocols in ovarian cortex tissue intended for fertility preservation. *Hum Reprod* 2015; **30** (4):870-876.
 50. Ernst EH, Offersen BV, Andersen CY, Ernst E. Legal termination of a pregnancy resulting from transplanted cryopreserved ovarian tissue due to cancer recurrence. *J Assist Reprod Genet* 2013; **30** (7): 975-978.
 51. Rauff S, Giorgione V, Yding Andersen C. Potential malignant cell contamination in transplanted ovarian tissue. *Expert Opin Biol Ther* 2016; **16** (3): 285-289.
 52. Dolmans MM, Marinescu C, Saussoy P, Van Langendonck A, Amorim C. Reimplantation of cryopreserved ovarian tissue from patients with acute lymphoblastic leukemia is potentially unsafe. *Blood* 2010; **116** (16):2908-2914.
 53. Jadoul P, Dolmans MM, Donnez J. Fertility preservation in girls during childhood: is it feasible, efficient and safe and to whom should it be proposed? *Hum Reprod Update* 2010; **16** (6):617-630.
 54. Rosendahl M, Andersen MT, Ralfkiaer E, Kjeldsen L, Andersen MK, Andersen CY. Evidence of residual disease in cryopreserved ovarian cortex from female patients with leukemia. *Fertil Steril* 2010; **94** (6):2186-2190.
 55. Liu S, Wang J, Niu W, Liu E, Wang J, Peng C, et al. The β 6-integrin-ERK/MAP kinase pathway contributes to chemo resistance in colon cancer. *Cancer Lett* 2013; **328** (2):325-334.
 56. Peters IT, Hilders CG, Sier CF, Vahrmeijer AL, Smit VT, Baptist Trimbos J, et al. Identification of cell-surface markers for detecting breast cancer cells in ovarian tissue. *Arch Gynecol Obstet* 2016; **294** (2):385-393.
 57. Bockstaele L, Boulenouar S, Van Den Steen G, Dechène J, Tsepelidis S, Craciun L, et al. Evaluation of quantitative polymerase chain reaction markers

- for the detection of breast cancer cells in ovarian tissue stored for fertility preservation. *Fertil Steril* 2015; **104** (2):410-417.
58. Meirow D, Biederman H, Anderson RA, Wallace WH. Toxicity of chemotherapy and radiation on female reproduction. *Clin Obstet Gynecol* 2010; **53** (4):727-739.
 59. Sonmezer M, Oktay K. Fertility preservation in female patients. *Hum Reprod Update* 2004; **10** (3):251-266.
 60. Tanbo T, Greggains G, Storeng R, Busund B, Langebrekke A, Fedorcsak P. Autotransplantation of cryopreserved ovarian tissue after treatment for malignant disease – the first Norwegian results. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2015; **94** (9): 937-941.
 61. Greve T, Clasen-Linde E, Andersen MT, Andersen MK, Sørensen SD, Rosendahl M, et al. Cryopreserved ovarian cortex from patients with leukemia in complete remission contains no apparent viable malignant cells. *Blood* 2012; **120** (22):4311-4316.
 62. Meirow D, Raanani H, Brengauz M, Dor J. Results of one center indicate that transplantation of thawed ovarian tissue is effective. Repeated IVF reveals good egg quality and high pregnancy rate. *Hum Reprod* 2012; **27**(2): i115-i117.
 63. Silber S, Pineda J, Lenahan K, DeRosa M, Melnick J. Fresh and cryopreserved ovary transplantation and resting follicle recruitment. *Reprod Biomed Online* 2015; **30**(6):643-650.
 64. Meirow D, Hardan I, Dor J, Fridman E, Elizur S, Ra'anani H, et al., Searching for evidence of disease and malignant cell contamination in ovarian tissue stored from hematologic cancer patients. *Hum Reprod* 2008; **23** (5):1007-1013.
 65. Kyono K, Doshida M, Toya M, Sato Y, Akahira J, Sasano H. Potential indications for ovarian autotransplantation based on the analysis of 5,571 autopsy findings of females under the age of 40 in Japan. *Fertil Steril* 2010; **93** (7): 2429-2430.
 66. Luyckx V, Durant JF, Camboni A, Gilliaux S, Amorim CA, Van Langendonck A, et al. Is transplantation of cryopreserved ovarian tissue from patients with advanced-stage breast cancer safe? A pilot study. *J Assist Reprod Genet* 2013; **30** (10): 1289-1299.

67. Sánchez-Serrano M, Novella-Maestre E, Roselló-Sastre E, Camarasa N, Teruel J, Pellicer A. Malignant cells are not found in ovarian cortex from breast cancer patients undergoing ovarian cortex cryopreservation. *Hum Reprod* 2009;**24** (9):2238-2243.
68. Rosendahl M, Timmermans Wielenga V, Nedergaard L, Kristensen SG, Ernst E, Rasmussen PE, et al. Cryopreservation of ovarian tissue for fertility preservation: no evidence of malignant cell contamination in ovarian tissue from patients with breast cancer. *Fertil Steril* 2011;**95** (6):2158-2161.
69. Donnez J, Dolmans MM, Demylle D, Jadoul P, Pirard C, Squifflet J, et al. Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet* 2004; **364** (9443):1405-1410.
70. Donnez J, Dolmans MM. Ovarian cortex transplantation: 60 reported live births brings the success and worldwide expansion of the technique towards routine clinical practice. *J Assist Reprod Genet* 2015;**32** (8): 1167-1170.
71. Lotz L, Maktabi A, Hoffmann I, Findeklee S, Beckmann MW, Dittrich R. Ovarian tissue cryopreservation and retransplantation – what do patients think about it?. *Reprod Biomed Online* 2016; **32**(4):394-400.
72. Meirow D, Roness H, Kristensen SG, Andersen CY. Optimizing outcomes from ovarian tissue cryopreservation and transplantation; activation versus preservation. *Hum Reprod* 2015; **30** (11):2453-2456.
73. Demeestere I, Simon P, Dedeken L, Moffa F, Tsépélidis S, Brachet C, Delbaere A, Devreker F, Ferster A. Live birth after autograft of ovarian tissue cryopreserved during childhood. *Hum Reprod* 2015;**30** (9):2107-2109.